

**PRIORITE
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



PCT/FR 99/02899
09/58271 1
REC'D 01 FEB 1999
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

25 NOV. 1998
Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

SIEGE
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

This Page Blank (uspto)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

30 DEC 1997

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 16673 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75

DATE DE DÉPÔT

30 DEC. 1997

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire



certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen

brevet d'invention

différencié immédiat

Établissement du rapport de recherche

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET ORES
6 avenue de Messine
75008 PARIS
FRANCE

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
MJPsd1067/1a 01.45.62.75.00

certificat d'utilité n°

date

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

EPITOPES PEPTIDIQUES RECONNUS PAR DES AUTO-ANTICORPS ANTIFILAGRINE PRESENTS DANS LE SERUM DES PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

BIOMERIEUX

Société anonyme

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

Pays

Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTIÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

VIALLE-PRESLES Marie-José (N° 93-2009)

**DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

MJPsd1067/1a**BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE****DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR**

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL**97 16673****TITRE DE L'INVENTION :**

**EPITOPES PEPTIDIQUES RECONNUS PAR DES AUTO-ANTICORPS ANTIFILAGRINE
PRESENTS DANS LE SERUM DES PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE
RHUMATOIDE**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**CABINET ORES
6 avenue de Messine
75008 PARIS
FRANCE**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1° SERRE Guy, Résidence du Lac, appartement 46, 10 avenue Winston Churchill, 31100 TOULOUSE
- 2° GIRBAL-NEUHAUSER Elisabeth, 22 rue Matelache, 31000 TOULOUSE
- 3° VINCENT Christian, 16 avenue de la Saune, 31650 LAUZERVILLE
- 4° SIMON Michel, 152 chemin du Pech, 31750 ESCALQUENS
- 5° SEBBAG Mireille, 3 rue A. Fredeau, 31500 TOULOUSE
- 6° DALBON Pascal, 6 boulevard Jules Favre, 69006 LYON
- 7° JOLIVET-REYNAUD Colette, 16 avenue des Colonnes, 69500 BRON
- 8° ARNAUD Michel, 63 rue Gervais Bussière, 69100 VILLEURBANNE
- 9° JOLIVET Michel, 16 avenue des Colonnes, 69500 BRON

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire**Le 14 avril 1998****VIALLE-PRESLES Marie-José (N° 93-2009)**

1

EPITOPES PEPTIDIQUES RECONNUS PAR DES AUTO-ANTICORPS
ANTIFILAGGRINE PRESENTS DANS LE SERUM DES PATIENTS
ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOÏDE.

La présente Invention est relative à de
5 nouvelles préparations d'antigènes spécifiquement
reconnus par des auto-anticorps spécifiques de la
polyarthrite rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde (ci après abrégée
en " PR ") est le plus fréquent des rhumatismes
10 inflammatoires chroniques. Il s'agit d'une maladie auto-
immune, et le sérum des patients atteints contient des
auto-anticorps dont certains sont spécifiques, et peuvent
constituer un marqueur de cette maladie, permettant son
diagnostic même à des stades précoce. Des recherches ont
15 donc été effectuées en vue d'identifier des antigènes
reconnus par ces anticorps, afin d'en obtenir des
préparations purifiées utilisables dans des techniques
classiques de diagnostic immunologique.

Des auto-anticorps spécifiquement présents
20 chez les malades atteints de PR et réagissant avec un
antigène épithérial oesophagien de rat ont été décrits
pour la première fois par B. J. J. YOUNG et al. dans Br.
Med. J. 2:97-99, (1979). Ces auto-anticorps ont été à
l'époque dénommés "anticorps antikératines".

25 Lors de précédents travaux, l'équipe des
Inventeurs a obtenu, à partir d'épithéliums malpighiens
humain et murin, des préparations d'antigènes apparentés
à la filaggrine et à la profilaggrine, reconnus
spécifiquement par les anticorps présents dans le sérum
30 de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et
montré que les "anticorps antikératines" étaient en
fait des auto-anticorps anti-filaggrine (ci-après
dénommés "AAF"). La Demande EP 0 511 116 décrit ces
préparations antigéniques, et leur utilisation pour le
35 diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.

Les filaggrines sont une famille de protéines qui a été identifiée chez diverses espèces, entre autres chez l'homme, le rat, la souris, le cobaye, au niveau des épithéliums malpighiens kératinisants [pour revue sur les 5 filaggrines, cf. DALE et al. [The Keratinocyte Handbook, Cambridge University Press, pp 323-350, (1994)]. Elles dérivent de la déphosphorylation et de la protéolyse d'un précurseur, la profilaggrine, qui est constituée essentiellement de domaines répétés de filaggrine séparés 10 par des segments peptidiques interdomaines.

Le gène codant pour la profilaggrine se compose de sous-unités répétées dont chacune code pour une molécule de filaggrine, séparées par des portions codant pour les segments peptidiques interdomaines. 15 Toutes les unités de répétition codant pour chacune des filaggrines humaines ont la même longueur (972 paires de base chez l'homme) ; cependant, chez l'homme, on observe des variations importantes (10-15%) de séquence d'une sous-unité à l'autre. Si la plupart sont conservatives, 20 certaines de ces variations induisent des changements d'acides aminés et dans certains cas des changements de la charge électrique de la protéine. Ainsi les filaggrines humaines forment, indépendamment des modifications post-transcriptionnelles, une population 25 hétérogène de molécules de taille similaire mais de séquences et de charges (pHi égal à $8,3 \pm 1,1$) différentes [GAN et al., Biochem. 29, p. 9432-9440 (1990)].

La profilaggrine est une protéine de poids 30 moléculaire élevé (environ 400 000 chez l'homme) soluble en présence de fortes concentrations de sels ou d'urée. Elle possède une forte teneur en acides aminés basiques (arginine et histidine), ainsi qu'en glycine, sérine et acide glutamique. Elle est pauvre en acides aminés non 35 polaires et ne contient ni méthionine, ni cystéine, ni tryptophane. Elle est fortement phosphorylée sur des

résidus sérine, ce qui lui confère un point isoélectrique proche de la neutralité.

La profilaggrine est clivée en unités filaggrine au cours d'un processus complexe de 5 maturation, impliquant une déphosphorylation, suivie d'un clivage par des protéases au niveau des segments interdomaines. Ce clivage génère d'abord des fragments de taille intermédiaire, puis les molécules fonctionnelles de filaggrine.

10 Les filaggrines issues de la déphosphorylation et du clivage de la profilaggrine sont des protéines basiques dont le contenu en acides aminés est similaire à celui des profilaggrines. Elles participent à l'organisation des filaments de kératine, et subissent 15 une maturation progressive au cours de laquelle les résidus arginine, basiques, sont convertis en résidus citrulline, neutres, sous l'action de la peptidylarginine déiminase [HARDING C.R. et SCOTT I.R., J. Mol. Biol. 170, p. 651-673 (1983)]. Ceci entraîne une réduction de leur 20 affinité pour les kératines dont elles se détachent ; elles sont alors totalement dégradées sous l'action de diverses protéases.

Les propriétés des filaggrines et des profilaggrines ont été particulièrement bien étudiées 25 chez le rat, chez la souris et chez l'homme. La taille de la profilaggrine varie, selon les espèces, de 300 à 400 kD et celle des filaggrines de 27 à 64 kD.

Le polymorphisme observé chez l'homme entre 30 les séquences des unités filaggrine à l'intérieur d'un même gène de profilaggrine n'apparaît pas chez le rat et la souris. Les filaggrines présentent en outre une grande variabilité inter et intra-spécifique au niveau de leur séquence. Cette variabilité n'affecte toutefois pas leurs propriétés fonctionnelles, ni leur composition globale en 35 acides aminés, et leurs propriétés biochimiques. De même, les localisations tissulaires de la profilaggrine et des

filaggrines sont identiques chez les différents mammifères étudiés.

En poursuivant leurs travaux, les Inventeurs ont constaté que la profilaggrine présente dans les 5 granules de kératohyaline de l'épiderme humain n'était contrairement aux filaggrines, pas reconnue par les AAF [SIMON et al. Clin. Exp. Immunol. 100, 90-98 (1995)]. Ils ont alors testé la réactivité des AAF avec de la filaggrine recombinante, et ont constaté que celle-ci non 10 plus n'était pas reconnue. D'autre part, il avait été précédemment observé que les formes des filaggrines épidermiques humaines principalement reconnues par les AAF étaient les formes acido-neutres décrites par SIMON et al. [J. Clin. Invest., 92, 1387, (1993)] et dans la 15 demande EP 0 511 116. Le fait que ces formes acido-neutres correspondent à un stade tardif de maturation de la filaggrine, permettait de supposer que tout ou partie des modifications post-traductionnelles intervenant jusqu'à ce stade étaient impliquées dans la formation des 20 épitopes reconnus par les AAF.

Pour vérifier cette hypothèse, les Inventeurs ont cherché à reproduire *in vitro*, à partir de filaggrine recombinante, ces modifications post-traductionnelles, afin de déterminer lesquelles étaient susceptibles 25 d'influer sur l'antigénicité de la filaggrine.

Ils ont ainsi constaté qu'en fait, la citrullination de la filaggrine suffisait à générer des épitopes reconnus par les AAF. En effet, ils ont observé, en procédant à la déimination *in vitro* de filaggrine 30 recombinante que le remplacement d'au moins une partie des arginines par des citrullines permet l'obtention d'un antigène reconnu spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR. Ils ont en outre localisé des régions qui étaient après citrullination, 35 fortement immunoréactives vis-à-vis des auto-anticorps anti-filaggrine. Il s'agit en particulier de la région

correspondant à la portion C-terminale (acides aminés 144 à 324) et en particulier aux acides aminés 144 à 314, ainsi que de la région correspondant aux acides aminés 76 à 144, et de la région correspondant aux acides aminés 71 à 119 d'une unité de filaggrine humaine. Ces travaux ont abouti à l'obtention d'antigènes artificiels reconnus spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR, et constitués par des polypeptides recombinants ou de synthèse, dérivés de la séquence de la filaggrine, ou de portions de celle-ci, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline. Ces antigènes, ainsi que leur utilisation, font l'objet de la Demande FR FR 96 10651, déposée le 30 août 1996 au nom de BIOMERIEUX.

En poursuivant leur travaux, les Inventeurs sont parvenus à sélectionner à partir de la séquence d'une unité filaggrine, des peptides dans lesquels la substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline donnait naissance à des épitopes reconnus spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR.

Les séquences de ces peptides sont identifiées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

On entend par : "unité filaggrine", un polypeptide dont la séquence est celle du produit de traduction de l'une quelconque des sous-unités codant pour un domaine filaggrine du gène de la profilaggrine humaine ou d'une autre espèce, ou bien est une séquence consensus, séquence théorique obtenue à partir des séquences des domaines filaggrine.

Les Inventeurs ont maintenant identifié des épitopes reconnus par les auto-anticorps anti-filaggrine : ces épitopes comprennent un motif tripeptidique centré sur un résidu citrulline, spécifiquement présent sur les peptides citrullinés

dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, et absent de la séquence SEQ ID NO: 4.

Il s'agit en particulier du motif tripeptidique Ser-Cit-His, dans lequel Cit représente un résidu citrulline.

La présente Invention a pour objet un peptide constituant un épitope reconnu par des autoanticorps anti-filaggrine présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce que ledit épitope comprend un motif tripeptidique centré sur un résidu citrulline, spécifiquement présent sur au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit peptide comprend au moins un motif pentapeptidique centré sur un résidu citrulline, présent sur au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

Avantageusement, ledit peptide comprend le motif tripeptidique Ser-Cit-His, dans lequel Cit représente un résidu citrulline.

A titre d'exemple, on citera des peptides qui comprennent le motif pentapeptidique, X1-Ser-Arg-His-X2 dans lequel X1=Ser ou Gly, et X2=Ser ou Pro, et parmi ceux-ci, des peptides qui comprennent le motif hexapeptidique X0-X1-Ser-Arg-His-X2, ou le motif heptapeptidique X0-X1-Ser-Arg-His-X2-X3, dans lesquels X1 et X2 sont tels que définis ci-dessus, X0=Asp, et X3=Gly ou Arg.

Les peptides conformes à l'invention permettent la préparation d'antigènes artificiels reconnus spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Ces antigènes artificiels font également partie de l'objet de la présente invention.

Des antigènes artificiels conformes à l'invention comprennent au moins un épitope peptidique centré sur un résidu citrulline, tel que défini ci-dessus. Ils sont par exemple constitués par des peptides 5 d'au moins 5 acides aminés, de préférence au moins 10 acides aminés, et avantageusement au moins 14 acides aminés. Il peut s'agir de peptides constitués par au moins un fragment d'au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, 10 SEQ ID NO: 6, ou contenant au moins un tel fragment. Ces peptides peuvent comprendre plusieurs épitopes citrullinés spécifiquement reconnus par les AAF, de séquences identiques ou différentes.

Le terme "peptide" tel qu'utilisé dans la 15 présente Demande signifie notamment protéine ou fragment de protéine, oligopeptide, extrait, séparé ou substantiellement isolé ou synthétisé, notamment ceux obtenus par synthèse chimique ou par expression dans un organisme recombinant ; tout peptide dans la séquence 20 duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un acide aminé de la série D, et vice-versa ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH, et avantageusement toutes les liaisons CO-NH de la chaîne peptidique est (sont) remplacée(s) par une (des) 25 liaisons NH-CO ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH et avantageusement toutes les liaisons CO-NH est ou sont remplacée(s) par une ou des liaison(s) NH-CO, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons CO-NH sus- 30 mentionnées, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyles constituant un peptide de référence, ces composés étant encore désignés immunorétroïdes, un mimotope, etc.

Des antigènes conformes à l'invention peuvent 35 par exemple être obtenus par action de la PAD (peptidyl arginine déiminase) sur des protéines ou des peptides

naturels, recombinants, ou de synthèse, comportant des résidus arginine, et en particulier comprenant au moins un résidu arginine constituant le centre d'un motif tripeptidique identique à ceux présents dans les 5 séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ; ils peuvent également être obtenus par synthèse peptidique, en incorporant directement un ou plusieurs résidus citrulline, et de préférence, un ou plusieurs épitopes comprenant un résidu citrulline, tels que définis ci-10 dessus, dans le peptide synthétisé.

La présente Invention a également pour objet l'utilisation des antigènes conformes à l'invention, tels que définis ci-dessus, pour le diagnostic *in vitro* de la PR.

15 La présente invention englobe en particulier des compositions antigéniques pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lesquelles compositions sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un 20 antigène conforme à l'invention, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse.

La présente Invention a également pour objet un procédé de détection des auto-anticorps de classe G spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, 25 lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :
- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps 30 spécifiques de la PR éventuellement présents ;
- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

Ce procédé de détection peut être mis en oeuvre grâce à un nécessaire comprenant au moins un 35 antigène selon l'Invention, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu

réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

Ledit nécessaire peut également comprendre, le 5 cas échéant, des échantillons de référence, tels qu'un ou plusieurs sérum(s) négatif(s) et un ou plusieurs sérum(s) positif(s).

La présente invention sera mieux comprise à 10 l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et de mise en œuvre d'antigènes conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : DEIMINATION IN VITRO DE FILAGGRINE RECOMBINANTE PAR LA PEPTIDYL ARGININE DEIMINASE (P.A.D.).

De la filaggrine recombinante est produite 15 selon le protocole suivant :

Un fragment d'ADN codant pour une unité filaggrine est amplifié par PCR, à partir d'ADN génomique humain (cellules RAJI : ATCC CCL86) à l'aide des 2 amorces suivantes :

20 Amorce 5' :

5' TTCCTATACCAGGTGAGCACTCAT 3'

Amorce 3' :

5' AGACCCCTGAACGTCCAGACCGTCCC 3'

Le produit d'amplification est cloné dans le 25 site SmaI du vecteur pUC19. On procède à la sélection des clones recombinants, en vérifiant la présence d'un insert de 972 pb obtenu après digestion avec SacI et XbaI. Cet insert est ensuite sous-cloné dans pUC19. L'insert résultant de ce sous-clonage est ensuite transféré dans 30 le vecteur pGEX (commercialisé par la société PHARMACIA), entre les sites EcoRI et HindIII. Le vecteur d'expression ainsi obtenu exprime, dans *E. coli*, la filaggrine en fusion avec la glutathion-S-transférase (GST), sous contrôle du promoteur procaryote Tac. La synthèse de la 35 protéine recombinante est induite par addition d'isopropyl-β-D-galactoside (IPTG) à la culture.

La filaggrine recombinante ainsi obtenue sera dénommée ci-après : " fil-gst ".

On constate après électrophorèse, l'existence de 9 fragments qui résultent d'une protéolyse post-5 traductionnelle de la filaggrine entière.

Le mélange des 9 fragments est soumis à une déimination *in vitro* par la peptidyl arginine déiminase.

On utilise une préparation de peptidyl arginine déiminase de muscle de lapin (681 U/ml) 10 commercialisée par TAKARA BIOMED EUROPE, selon le protocole préconisé par le fabricant.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Milieu réactionnel : Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂, 15 10 mM, DTT 5 mM, pH 7,4 ;
- Rapport enzyme/substrat : 140 mU/μmole de filaggrine contenant 10% d'arginine soit 4 mU/μmole d'arginine ;
- Incubation : entre 0 et 60 mn à 50°C ;
- Arrêt de la réaction : chauffage 3 mn en tampon de LAEMMLI

On effectue en parallèle les 8 réactions suivantes.

(1) BSA (sérum albumine bovine) incubée dans 25 milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.

(2) BSA incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(3) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.

30 (4) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (5 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(5) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (15 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(6) fil-gst incubée dans milieu réactionnel 35 (30 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(7) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(8) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D. et en présence de 10 mM de N-éthylmaléimide (inhibiteur de la P.A.D.).

On dépose 1 µl de chaque échantillon sur un gel d'électrophorèse (gel PHAST[®]-SDS 12,5%, PHARMACIA), et on réalise l'électrophorèse avec l'appareil PHAST-SYSTEM[®] (PHARMACIA), dans les conditions préconisées par le fabricant. Après transfert sur nitrocellulose, on révèle soit avec un pool de 5 sérums de patients atteints de PR, dilué au 1/2000 soit avec l'anticorps monoclonal anti-filaggrine AHF2 [SIMON et al. J. Invest. Dermatol. 105, 432, (1995)] à la concentration de 0,2 µg/ml.

Le complexe antigène/anticorps est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, par la technique ECL.

Les résultats montrent qu'en l'absence de réaction de citrullination, la fil-gst n'est pas reconnue par les sérums de patients atteints de PR, alors que dès 5 minutes de citrullination, elle est détectée par ces sérums. On constate une augmentation de la réactivité avec le pool de sérums quand on fait agir la P.A.D. pendant 60 minutes à 50°C.

En outre, ces résultats permettent de supposer qu'il existe un ou plusieurs épitopes de forte affinité dans la moitié COOH-terminale de la filaggrine (positions 144 à 324), cet ou ces épitope(s) étant répété(s) entre les positions 76 et 144.

30 EXEMPLE 2 : CITRULLINATION DES PEPTIDES S-47-S ET S-35-R PAR LA P.A.D, ET ESSAI DE LA REACTIVITE DES PEPTIDES CITRULLINES.

Le peptide de 49 acides aminés S-47-S de séquence (code 1 lettre) :

35 NH₂-STGHSGSQHSHTTQGRSDASRGSSGSRSTSRETRDQEQSGDGSRHSGS-COOH

correspondant aux acides aminés 71 à 119 de la séquence d'une unité de filaggrine humaine, et comportant 6 résidus arginine, et

le peptide de 37 acides aminés S-35-R de 5 séquence (code 1 lettre) :

NH2-SQDRDSQAQSEDSERRSASASRNHRGSAQEQRDGSR-COOH

correspondant aux acides aminés 155 à 191 de la séquence d'une unité de filaggrine humaine, et comportant 7 résidus arginine, ont été préparés par 10 synthèse peptidique. Les peptides S-47-S et S-35-R sont représentés dans la liste de séquences en annexe sous les numéros respectifs SEQ ID NO: 3 et SEQ ID NO: 4.

Ces 2 peptides, ainsi que la fil-gst, ont été citrullinés par action de la P.A.D., pendant 30 minutes à 15 50°C, dans le même milieu réactionnel que celui indiqué à l'exemple 1. Les conditions spécifiques pour chaque peptide, et pour la fil-gst sont les suivantes :

- peptide S-47-S : 4 mU/μmole arginine
- peptide S-35-R : 2,7 mU/μmole arginine
- 20 - fil-gst : comme indiqué à l'exemple 2.

On compare, par "dot-blot", la réactivité de chaque peptide et celle de la fil-gst, avant et après action de l'enzyme, vis-à-vis de l'anticorps monoclonal AHF4, et du sérum d'un patient atteint de PR.

25 Les conditions opératoires sont les suivantes :

- 0,5 μg par dépôt de chaque antigène (peptides, fil-gst, variants acido-neutres de la filaggrine (VAF))

30 - Traitement de la nitrocellulose 45 minutes à 80°C, avant immunodétection.

- sérum PR utilisé à la dilution de 1/2000 ; anticorps monoclonal AHF4 utilisé à une concentration de 0,2 μg/ml

35 Les résultats montrent que :

- AHF4 reconnaît le peptide S-47-S et la fil-gst citrullinés ou non, mais ne reconnaît pas S-35-R, citrulliné ou non.

5 - S-47-S est reconnu, après citrullination, par le sérum du patient atteint de PR, alors que S-35-R, citrulliné ou non, n'est pas reconnu. Le même sérum reconnaît par ailleurs les VAF et la fil-gst citrullinée, mais ne reconnaît pas la fil-gst non-citrullinée.

EXEMPLE 3 : SYNTHESE DES PEPTIDES E-12-H ET E-12-D
 10 **CITRULLINES ET NON CITRULLINES ET ESSAI DE LA REACTIVITE DES PEPTIDES.**

Les peptides E-12-H et E-12-D ont été déterminés par référence aux séquences nucléotidiques du gène de la profilaggrine humaine décrites par GAN S.Q et 15 al. [Biochemistry, 29 : 9432-9440, (1990)].

Le peptide de 14 acides aminés E-12-H de séquence (code 1 lettre) :

NH₂-EQSADSSRHS^GSGH-COOH

comprend 1 résidu arginine, et

20 le peptide de 14 acides aminés E-12-D de séquence (code 1 lettre) :

NH₂-ESSRDGSR^RHPRSHD-COOH

comprend 3 résidus arginine.

Les peptides E-12-H et E-12-D sont représentés 25 dans la liste de séquences en annexe sous les numéros respectifs SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6.

Ces peptides ont été préparés par synthèse peptidique en phase solide.

Les peptides E-12-H et E-12-D citrullinés ont 30 été synthétisés directement par incorporation d'une citrulline en remplacement d'une arginine.

Pour le peptide E-12-D, seul le résidu arginine correspondant au 8^{ème} acide aminé de la séquence a été remplacé par une citrulline lors de la synthèse 35 peptidique.

La réactivité de chaque peptide citrulliné et non citrulliné a été testée respectivement vis-à-vis d'un sérum normal, de deux sérum de patients PR, d'anticorps anti-filaggrine (AFAs) purifiés à partir d'un pool de 45 sérum de patients PR et d'anticorps anti-filaggrine purifiés à partir de 12 sérum de patients PR.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

Les puits de plaques de microtitration NUNC MAXISORP ont été revêtus respectivement à l'aide des peptides E-12-D et E-12-H non-citrullinés et citrullinés, dilués à une concentration de 5 µg/ml dans un tampon PBS (pH: 7,4) et incubés pendant une nuit à 4°C (volume final : 100 µg/puits). Les puits ont été saturés pendant 30 minutes à 37°C en PBS-Tween 20, 0,05% gélatine 2,5%, 200 µl/puits. Le sérum de contrôle négatif (sérum normal) a été dilué au 1/120. Les anticorps anti-filaggrine ont été dilués en PBS-Tween 20, 0,05%-gélatine 0,5% (PBS TG) de sorte que les concentrations finales en auto-anticorps anti-filaggrine soient celles indiquées dans le tableau I annexé. Le sérum de contrôle négatif, les sérum PR et les anticorps anti-filaggrine ont été ajoutés (volume final : 100 µl/puits) et soumis à incubation pendant 1 heure à 37°C et une nuit à 4°C. Des anticorps de chèvre anti-chaînes lourdes gamma des immunoglobulines humaines, marqués à la peroxydase (commercialisés par la société SOUTHERN BIOTECHNOLOGIES) ont été ajoutés dans chaque puits (dilution en PBSTG : 1/2000, volume final : 100 µl/puits) et soumis à incubation pendant 1 heure à 37°C. La révélation a été effectuée par addition d'ortho-30 phénylénediamine (2mg/ml, pendant 10 minutes).

Les résultats présentés dans le tableau I annexé sont donnés en rapport de DO à 492 nm : signal peptide citrulliné/signal peptide non-citrulliné.

Ces résultats montrent que, dans la majorité 35 des cas, le rapport en DO peptide citrulliné/peptide non-citrulliné est supérieur à 1, et illustrent donc la bonne

sensibilité des peptides citrullinés par rapport aux peptides non-citrullinés pour leur réactivité vis-à-vis des autoanticorps anti-filaggrine.

TABLEAU I

Peptide	Sérum de		Sérum PR1		Sérum PR2		Pool d'AFAS		AFAS purifiés à partir de 12 sérum PR						
	contrôle	10*	10*	20*	5*	10*	20*	5*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*
E-12-D	1,076	1,42	1,85	2,42	3,77	5,57	1,77	1,63	1,48	1,99	1,38	2,48	1,19	1,12	3,50
E-12-H	1	1,32	1,20	10,44	11,51	8,38	2,45	2,42	1,82	7,16	2,05	1,06	1,18	0,76	13,57
															4,14
															3,18
															1,14
															3,66
															1,22
															5,84

* : Concentration en AFAS en $\mu\text{g}/\text{ml}$.

LISTE DE SEQUENCES

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTCCTATAACC AGGTGAGCAC TCAT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AGACCCCTGAA CGTCCAGACC GTCCC

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 49 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Ser	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Ser	Gln	His	Ser	His	Thr	Thr	Thr	Gln	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ser	Asp	Ala	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Arg
20					25						30				

Glu	Thr	Arg	Asp	Gln	Glu	Gln	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser	Arg	His	Ser	Gly
35						40					45				

Ser

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

1	Ser Gln Asp Arg Asp Ser Gln Ala Gln Ser Glu Asp Ser Glu Arg Arg	15
5	10	

20	Ser Ala Ser Ala Ser Arg Asn His Arg Gly Ser Ala Gln Glu Gln Ser	30
25	30	

35	Arg Asp Gly Ser Arg	
----	---------------------	--

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

1	Glu Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gly Ser Gly His	10
5	10	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

1	Glu Ser Ser Arg Asp Gly Ser Arg His Pro Arg Ser His Asp	10
5	10	

REVENDICATIONS

- 1) Peptide comprenant un épitope reconnu par des autoanticorps anti-filaggrine présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce que ledit épitope comprend un motif tripeptidique centré sur un résidu citrulline, spécifiquement présent sur au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.
- 10 2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend le motif tripeptidique Ser-Cit-His, dans lequel Cit représente un résidu citrulline.
- 15 3) Antigène artificiel reconnu spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué par au moins un peptide selon une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 20 4) Utilisation d'un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, pour le diagnostic *in vitro* de la polyarthrite rhumatoïde.
- 25 5) Composition antigénique pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse.
- 30 6) Procédé de détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :
 - la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, dans des conditions permettant la formation d'un

complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde éventuellement présents ;

5 - la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

7) Nécessaire pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un antigène selon quelconque des 10 revendications 1 à 3, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.